

Aus der Nuklearmedizinischen Abteilung der Medizinischen
Kliniken der Freien Universität Berlin im Städt.
Krankenhaus Westend

Leiter: Professor Dr. med. Karl O e f f

Einfluß alkylierender Zytostatika auf Yoshida-Ascites-
Sarkomzellen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

R e i n e c k e, Albrecht
aus Magdeburg

1969
—

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Nuklearmedizinischen Abteilung der Medizinischen
Kliniken der Freien Universität Berlin im Städt.
Krankenhaus Westend

Leiter: Professor Dr. med. Karl O e f f

Einfluß alkylierender Zytostatika auf Yoshida-Ascites-
Sarkomzellen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

R e i n e c k e, Albrecht
aus Magdeburg

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

Referent: Priv.Doz.Dr.rer.nat. Eberhard L i s s

Korreferent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 3. April 1969

Inhaltsübersicht

Einleitung und Problemstellung	4
Methodik	7
Ergebnisse	10
A. Beeinflussung biochemischer Parameter und Hemmung der Zellvermehrung von Yoshida-Ascites-Sarkomzellen nach Behandlung mit verschiedenen alkylierenden Verbindungen	
1. Mitomen in vitro	10
2. Trenimon in vivo	12
3. Endoxan in vitro und in vivo	13
B. Einfluß von Änderungen des Incubationsmilieus auf die Wirkung von alkylierenden Verbindungen	
1. Glucose	15
2. Glutamin	18
C. Vergleichende Untersuchungen an Yoshida-Ascites- Sarkomzellen von Ratte und Maus	22
D. Anhang (Versuche zur Erzeugung eines resistenten Tumors)	24
Diskussion	27
Zusammenfassung	30
Literaturübersicht	31

Einleitung und Problemstellung

Der Chemotherapie maligner Tumoren ist bis heute der entscheidende Erfolg versagt geblieben. Im Zellstoffwechsel der Tumorzellen sind bisher keine spezifischen Reaktionen gefunden worden, die die Tumorzellen von normalen Zellen unterscheiden und an denen eine gezielte Chemotherapie angreifen könnte. Außerdem müssen durch die Behandlung Zellen getroffen werden, die dem Wirtsorganismus genetisch sehr viel näher stehen, als beispielsweise die Bakterien, die durch chemotherapeutische Maßnahmen wesentlich leichter zu bekämpfen sind. (DOMAGK, 1966)

Die Ergebnisse der bisherigen Therapie mit zytostatisch wirkenden Substanzen beruhen daher auf der Ausnutzung quantitativer Unterschiede, wobei durch die Behandlung besonders jene Zellverbände in ihrem Wachstum behindert werden, die eine große Zellproliferation aufweisen. Daraus resultiert nun einerseits die große zytostatische Empfindlichkeit aller Organe mit starkem Zellumsatz, wie z.B. Knochenmark, Keimdrüsen und Epithe im Magen-Darm-Kanal, die der Therapie mit alkylierenden Zytostatika enge Grenzen setzt. Zum anderen erklärt sich die häufige Resistenz der meisten Karzinome gegenüber der Krebschemotherapie auf Grund ihrer geringen Proliferation wie auch ihrer schlechten Durchblutung. (GROSS, 1964)

Die heute in der Klinik verwendeten Zytostatika vom Typ der alkylierenden Verbindungen vermögen im physiologischen pH-Bereich mit reaktionsfähigen Gruppen anderer Moleküle zu reagieren, wobei an aktive Molekülzentren Teile der alkylierenden Verbindungen angelagert werden können. Als alkylierungsfähige Endgruppen kommen u.a. Carboxyl- und Imidazolgruppen, SH-Gruppen und α -Aminogruppen in Frage. (ROSS, 1962) Es ist verständlich, daß die Alkylierung völlig unspezifisch erfolgt, und so eine große Anzahl von Enzymen, die als Eiweißmoleküle diese Gruppen in großer Zahl aufweisen, inaktiviert werden können.

Häufig wird eine direkte Alkylierung der DNS durch Alkylantien als Ursache der Zytostase diskutiert, wobei den bi- und polyvalenten Verbindungen besondere Bedeutung zukommen soll. Die gemessenen Alkylierungsraten an der DNS sind zwar sehr gering

(RÜTTMANN, 1964), aber nach PÜTTER (1966) könnte ein Molekül pro Zelle für den zytostatischen Effekt ausreichen, "wenn das Alkylans an idealer Stelle reagiert."

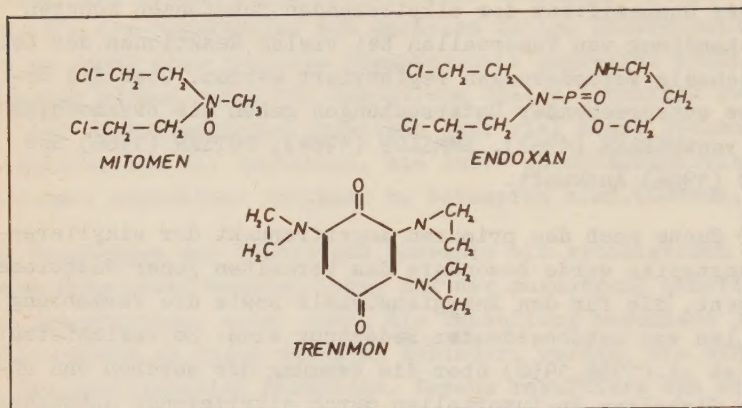
Wegen der Unspezifität der alkylierenden Substanzen konnten nach Behandlung von Tumorzellen bei vielen Reaktionen des Zellstoffwechsels Veränderungen registriert werden. Über die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen geben die Zusammenfassungen von WHEELER (1962), EMMELOT (1964), PÜTTER (1966) und SCHMIDT (1966) Auskunft.

Auf der Suche nach dem primären Angriffspunkt der alkylierenden Zytostatika wurde besonders das Verhalten jener Reaktionen untersucht, die für den Energiehaushalt sowie die Vermehrung der Zellen von entscheidender Bedeutung sind. So berichteten HOLZER et al. (1956, 1958) über die Hemmung der aeroben und anaeroben Glykolyse in Tumorzellen durch alkylierende Substanzen als Folge einer Senkung des DPN-Gehaltes. Eine Beeinflussung der Proteinsynthese von Tumorzellen bei der Behandlung mit Alkylantien beobachteten HÖLZEL (1961) und HÖLZEL u. MAASS (1962).

Eine Erniedrigung der Synthese von Nukleinsäuren mit alkylierenden Substanzen erreichten u.a. TRAMS et al. (1961), RATHGEN et al. (1960), HILZ et al. (1962/63) und WHEELER (1964). Da LISS und PALME (1964) die DNS-Synthese als den empfindlichsten Vorgang unter mehreren gleichzeitig gemessenen Reaktionen herausgestellt hatten, wird in den folgenden Versuchen vor allem die DNS-Synthese als geeigneter biochemischer Parameter bei der Beurteilung der Wirksamkeit alkylierender Substanzen bewertet. Bei einigen Versuchen wurde vergleichsweise die Proteinsynthese gemessen.

Die Untersuchungen wurden mit dem Methyl-bis(2-chloräthyl)-amin-N-oxyl („Mitomen“ Asta), dem 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon(1,4) („Trenimon“ Bayer) und dem N,N-bis(2-chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäurediamid („Endoxan“ Asta) durchgeführt. (Abb. 1) Wegen der Unwirksamkeit des Endoxans auf isolierte Tumorzellen wurden für die in vitro Versuche Umwandlungsprodukte des Endoxans verwendet, die sich im Harn von Kaninchen befinden, welche mit Endoxan behandelt worden waren. (KLINKE et al. 1965, LISS et al. 1966)

Abb. 1



Obwohl die Transplantationstumoren nicht ohne weiteres mit den im Organismus entstandenen malignen Tumoren vergleichbar sind, (SCHMÄHL (1963) bezeichnete sie als „Gewebekulturen in vivo“) geben sie doch brauchbare Modelle zur Untersuchung zytostatischer Verbindungen ab. Aus der Vielzahl der experimentell erzeugten Tumoren wurde das Yoshida-Sarkom der Ratte ausgewählt, das u.a. für seine große Aggressivität der Ratte gegenüber bekannt ist; die Überlebenszeit der Tiere beträgt nach i.p. Verimpfung 6 ± 3 Tage und nach subcutaner Übertragung 23 ± 6 Tage. (SCHMÄHL, 1965) Eine Zellvermehrung findet bereits bei Übertragung sehr kleiner Zellzahlen statt. Nach DRUCKREY (1964) soll bereits die Transplantation einer einzigen Zelle für das Angehen eines Tumors ausreichen. Andererseits zeichnen sich Yoshidazellen durch eine besonders gro- ße Empfindlichkeit gegenüber zytostatischer Behandlung aus. (BROCK, 1958 u. 1963 sowie DRUCKREY, 1961)

Methodik

Für die Untersuchungen diente eine seit über 50 Passagen auf CF₁-Mäusen wachsende Generationslinie des normalerweise auf der Ratte gehaltenen Yoshida-Ascites-Sarkoms als Untersuchungsobjekt. Dieses Vorgehen erschien vorteilhaft, weil sich von der Maus im Gegensatz zur Ratte ein unblutiger Ascites gewinnen läßt und die Ascitestiere eine längere Lebensdauer aufweisen. Außerdem war die Tierhaltung weniger aufwendig. Aus vergleichenden Untersuchungen (Tab. 8 u. 9 Seite 22) ging hervor, daß zwischen dem auf der Ratte und dem auf der Maus gewachsenen Yoshida-Ascites-Sarkom kein Unterschied in der Empfindlichkeit gegen alkylierende Substanzen bestand.

5-7 Tage nach der Transplantation wurde der Ascites mit einer heparinbenetzten Spritze entnommen und mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Für einige Versuche gelangten 1-2x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Zellen zur Anwendung. Die Zellkonzentration wurde durch Abzentrifugieren der Zellen in Hämatokrit-Röhrchen bestimmt.

Die Incubationen fanden bei 37°C mit 1%iger Zellsuspension statt und dauerten im allgemeinen 80 min. Als Incubationsmedium diente eine Ringer-Phosphatpuffer-MgCl₂-Lösung (90 Teile Ringer, 30 Teile isoton. Phosphatpuffer pH 7,4 und 1 Teil 0,11m MgCl₂). Bei einigen Versuchen wurde statt dessen mit einer Ringer-Tris-phosphatpuffer-Lösung (90 Teile Ringer, 25 Teile isoton. Trispuffer pH 7,4, 5 Teile isoton. Phosphatpuffer pH 7,4 und 1 Teil 0,11m MgCl₂) gearbeitet. An Glucose wurden in soweit verwendet 1-2mg/ml zugesetzt, an Glutamin 50µg/ml. Ansätze mit Glucose erhielten nach 30 min 0,05ml einer 1,3%igen Bicarbonatlösung zum Abpuffern der gebildeten Milchsäure. Die Zugabe der kurz zuvor in phys. Kochsalzlösung gelösten Zytostatika erfolgte unmittelbar vor dem Beginn der Incubation.

Die radioaktiven Verbindungen wurden 50 min nach Versuchsbeginn zugegeben. Zur Anwendung kamen H³Thymidin (spez. Aktivität 1,9C/mM, 0,3µC pro Ansatz) und C¹⁴Leucin (20µg mit 0,1µC pro Ansatz).

Nach dem Ende der Incubationszeit wurden die Zellsuspensionen im Eisbad schnell auf 0°C abgekühlt und scharf abzentrifugiert. Aus dem Rückstand (alle Angaben auf 50mg frische Zellen) wurden die säurelöslichen Verbindungen durch Behandeln mit 2ml $0,2\text{n HClO}_4$ für 15 min bei 0°C extrahiert. Der Säureextrakt fand in einigen Versuchen zur Messung der UV-Absorption bei 240 und 260m μ und zur Bestimmung des ATP-Gehaltes (ATP-Test „Boehringer“) Verwendung.

Der zweimal mit je 5ml Alkohol gewaschene Rückstand wurde mit 2ml 10%iger Trichloressigsäure 60 min auf 90°C erhitzt. Der nach Abkühlen und Abzentrifugieren erhaltene Überstand enthält die Nukleinsäuren. Zur Entfernung der bei der Radioaktivitätsmessung störenden Trichloressigsäure wurde der Überstand nach Zusatz von 0,5ml Alkohol mit 3ml Äther ausgeschüttelt. Die abgetrennte wässrige Phase wurde auf 3ml mit Wasser aufgefüllt. In einem Teil der Lösung wurde der DNS-Gehalt bestimmt (Verfahren nach BURTON, 1956). Mit einem Gemisch von einem Teil Ansatzlösung und 9 Teilen Naphthalin-Dioxan-Scintillatorenlösung (WENZEL u. SCHULZE, 1962) wurde die H^3 Aktivität im Tri-Carb-Liquid-Scintillationszähler gemessen. Die Zählausbeute betrug im allgemeinen 15%. Aus dem DNS-Gehalt der Lösung und der H^3 Aktivität wurde die spezifische Aktivität in Imp./min/ $\mu\text{Mol DNS-P}$ errechnet.

Die im Rückstand verbliebenen Proteine wurden nach nochmaligem Erhitzen mit Trichloressigsäure und Waschen mit Alkohol in 1ml $0,1\text{n NaOH}$ gelöst und mit Wasser auf 10ml aufgefüllt. Zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der Lösung diente das Verfahren von LOWRY (1951). Die C^{14} Aktivität wurde in einem Gemisch aus einem Teil Ansatzlösung und 5 Teilen Dioxan-Scintillator bestimmt. Die Zählausbeute lag bei etwa 55%. Die spezifische Aktivität der Proteine in Imp./min/mg Protein wurde aus dem Proteingehalt und der C^{14} Aktivität der Lösung berechnet.

Für in vivo Versuche gelangten Mäuse mit 4-6 Tage altem Ascites zur Anwendung. Im allgemeinen 8 Stunden nach Applikation der Zytostatika erhielten die Tiere die in phys. NaCl aufgenommenen aktiven Verbindungen i.p. . Pro Gramm Körpergewicht wurden

10^{-6} μ Mol Thymidin mit 0,25 μ C H^3 Thymidin und 2 μ g Leucin mit 0,09 μ C C^{14} Leucin verwendet. 60 min danach wurden die Tiere getötet und die Tumorzellen in eiskalter phys. NaCl aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte die Aufarbeitung einer bestimmten Zellmenge (etwa 70mg) in gleicher Weise wie bei den in vitro Versuchen.

Zum Nachweis der biologischen Wirksamkeit alkylierender Verbindungen diente der von SCHMAHL und DRUCKREY(1956) entwickelte Incubationstest in abgewandelter Form. Die aus den in vivo bzw. aus den in vitro Versuchen stammenden Zellen wurden bei ca. 750 Umdrehungen/min abzentrifugiert und vorsichtig mit phys. NaCl aufgenommen. Etwa 15mg Zellen wurden auf unbehandelte Mäuse i.p. übertagen. Nach 7 Tagen wurden die Tiere getötet und die Ascitesmengen gemessen.

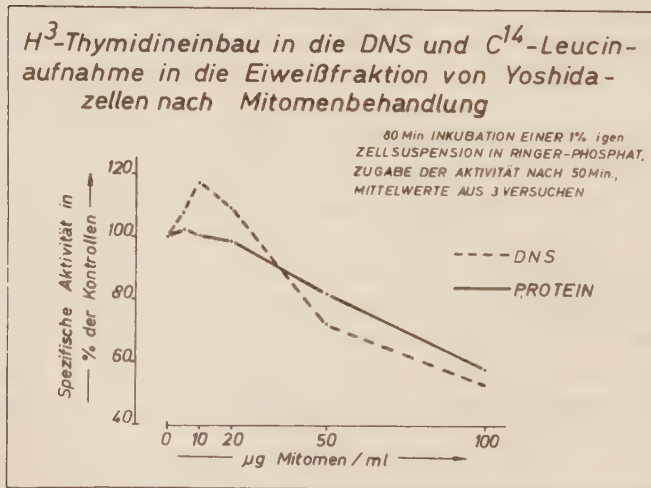
Ergebnisse

A. Beeinflussung biochemischer Parameter und Hemmung der Zellvermehrung von Yoshida-Ascites-Sarkomzellen nach Behandlung mit alkylierenden Verbindungen

1. Mitomen in vitro

Als Maß für die Wirkung von Mitomen wurde die Hemmung der DNS- und der Proteinsynthese an Hand der Incorporation von H^3 Thymin in die DNS und C^{14} Leucin in die Eiweißfraktion gemessen. Abb.2 zeigt, daß 50 μ g Mitomen/ml erforderlich sind, um eine Senkung von DNS- und Proteinsynthese herbeizuführen. Bei der DNS- und Proteinsynthese traten nahezu ähnliche Hemmeffekte auf. Eine Steigerung der DNS-Synthese, wie sie im vorliegenden Fall unter dem Einfluß kleiner Mitomendosen in Erscheinung trat, wurde auch von RÜTHER et al.(1966) unter Einfluß niedriger Trenimonkonzentrationen beobachtet.

Abb. 2



Über die Vermehrung von Yoshidazellen nach der Incubation mit Mitomen geben die in Tab.1 zusammengefaßten Versuche Auskunft. Aus ihnen geht hervor, daß durch eine Mitomenkonzentration von 4µg/ml die Transplantierbarkeit völlig aufgehoben wurde und daß bereits durch 2µg/ml eine sichere Wachstumshemmung eingetreten war

Tab. 1

<i>In vivo Vermehrung von Yoshida-Sarkomzellen nach Behandlung mit Mitomen in vitro</i> ÜBERTRAGUNG VON JE 15mg ZELLEN NACH 80min INKUBATION IN RINGER-PHOSPHAT-LÖSUNG				
Mitomen µg/ml	Ascitesmengen nach 7 Tagen in ml			
	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
0	0,8 ; 0,9	1,1, 4,7; 1,7; —	1,2 ; 1,0; 1,2; 1,1	1,5; 0,4; 2,0
0,4	↑ nicht untersucht ↓	1,6 ; 1,3	← nicht untersucht →	
1,0		2,5 ; 1,3	2,0 ; 1,1	3,0; 0,5; 1,8
2,0		nicht untersucht	— ; —	2,0; 1,0, —
4,0		— ; —	— ; —	— , — , —
10,0		— , —	— ; —	nicht untersucht

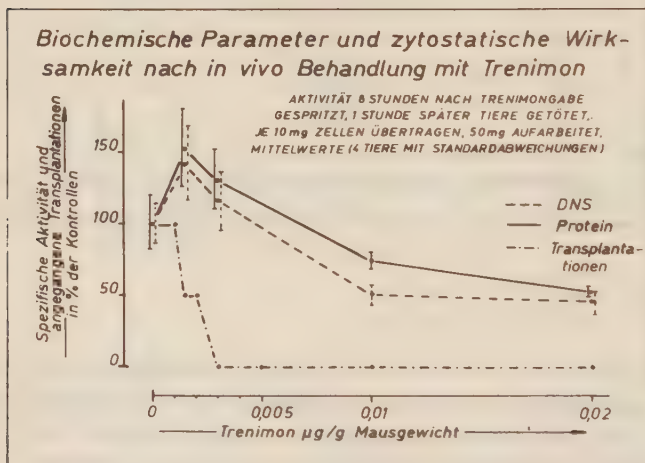
Der Vergleich der in Abb.2 und Tab.1 wiedergegebenen Versuche zeigt, daß für eine deutliche Hemmung des H^3 Thymidineinbaus in die DNS (auf 70% der Kontrollen durch 50µg/ml) mindestens die 20fache Konzentration an Mitomen erforderlich ist als für die Hemmung der Zellvermehrung (Nichtangehen der Transplantationen in 3 von 5 Fällen nach Incubation der Zellen mit 2µg/ml). Es ist also unwahrscheinlich, daß die Hemmung der DNS-Synthese der für die Hemmung der Zellvermehrung ausschlaggebende biochemische Parameter ist.

2. Trenimon in vivo

Bei der Untersuchung des Einflusses von Trenimon auf Yoshida-Asciteszellen in vitro fand LISS(1966), daß für die Hemmung der DNS-Synthese etwa das 1000fache der Dosis erforderlich war, die für die Aufhebung der Transplantierbarkeit ausreichte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in vivo Wirksamkeit von Trenimon auf Yoshidazellen 9 Stunden nach der Verabreichung untersucht. Der Abb.3 ist zu entnehmen, daß DNS- und Proteinsynthese nach einer anfänglichen auch hier bei kleinen Dosierungen auftretenden Steigerung (siehe Seite 10) etwa im gleichen Ausmaß gehemmt werden. Eine deutliche Hemmung vor allem der DNS-Synthese trat bei der Dosis von 0,01µg/g auf.

Abb. 3



Bei der Beurteilung der Zellvermehrung nach der Transplantation wurde wegen der sehr unterschiedlichen Ascitesmengen in den einzelnen Tieren nur bewertet, ob Ascites vorhanden war oder nicht. Es erscheint auch zweifelhaft, daß die Erniedrigung der jeweils gemessenen Ascitesmenge streng proportional zu

einer Dosiserhöhung der Zytostatika verlaufen muß, weil nach einer Mitteilung von DONTENWILL et al.(1964) zwischen Zellzahl und Ascitesmenge keine eindeutigen Beziehungen bestehen müssen. Nach Abb.3 genügt $1/5$ der Trenimondosis, die zu einer Hemmung der DNS-Synthese führte (auf 50% mit 0,01µg Trenimon /g Mausgewicht), um die Transplantierbarkeit in 50% der Fälle (etwa 0,002µg Trenimon/g Mausgewicht) aufzuheben.

Der Abstand zwischen den Dosierungen, die für die Hemmung der DNS-Synthese bzw. die Hemmung der Zellvermehrung erforderlich sind, ist damit wesentlich kleiner als bei den in vitro Versuchen (LISS,1966). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß der H^3 Thymidineinbau bei den hier wiedergegebenen in vivo Versuchen erst 8 Stunden nach der Gabe des Trenimons gemessen wurde. Nach dieser Zeit kann eine Hemmung durchaus sekundär sein und mit den Veränderungen im Generationszyklus der Zellen zusammenhängen (LISS et al.1968). Auch diese Versuche mit Trenimon sprechen daher nicht dafür, daß die Hemmung der DNS-Synthese die Ursache der Hemmung der Zellvermehrung ist.

3. Endoxan in vitro und in vivo

Ähnliche Beziehungen zwischen Hemmung der DNS-Synthese und Hemmung der Zellvermehrung, wie sie bei in vitro Versuchen mit Trenimon beobachtet wurden (LISS,1966), traten auch bei in vitro Versuchen mit Endoxanumwandlungsprodukten auf.

Wie bereits oben erwähnt ist Endoxan in vitro unwirksam. Die Versuche wurden daher mit den Umwandlungsprodukten durchgeführt, die sich im Harn von Kaninchen befinden, denen Endoxan verabreicht worden war. Quantitative Angaben über die Menge der Umwandlungsprodukte waren möglich, weil das verwendete Endoxan mit H^3 markiert worden war. Aus der spez. Aktivität des applizierten Endoxans und der Aktivität der Umwandlungsprodukte im Kaninchenharn ließ sich die vorliegende Menge errechnen (KLINKE et al.1965 u. LISS et al.1966).

Aus Tab.2 geht hervor, daß bei in vitro Incubation von Yoshidazellen mit Endoxanwirkprodukten bereits 1µg/ml ausreichen, um die Transplantierbarkeit der Zellen völlig aufzuheben.

(Kleinere Dosen wurden nicht untersucht, eventuell liegt die wirksame Dosis noch niedriger.) Selbst die 150fache Dosis reichte noch nicht aus, um eine Hemmung des H^3 Thymidineinbaus in die DNS hervorzurufen. Wie bei den Trenimonversuchen trat sogar eine leichte Steigerung des Einbaus auf.

Tab. 2

Zytostatischer Effekt und biochemische Parameter nach Inkubation von Yoshidazellen mit Endoxanwirkstoffen <i>80 min inkubiert, 1% Zellsuspension in Ringer-Phosphat, Aktivität 30min vor Ende gegeben, Mittelwerte aus Doppelansätzen, 15mg an je 3 Mäuse transplantiert</i>						
Spezifische Aktivität	Endoxanwirkprodukte $\mu\text{g/ml}$					
	0	1	2,5	10	20	150
der DNS <i>(Imp. $\times 10^3/\text{Min.}/\mu\text{Mol DNS-P}$)</i>	36,4	← nicht untersucht →			41,0	40,8
des Proteins <i>(Imp. $\times 10^3/\text{Min.}/\text{mg Protein}$)</i>	1,80	← nicht untersucht →			1,83	2,02
Ascites nach 7 Tagen in ml	1,8 2,2 2,0	← in keinem Tier Ascites →				

Bei der in vivo Behandlung von Mäusen mit Yoshida-Ascitestumoren wurde gefunden, daß die Transplantierbarkeit bei einer Endoxandosierung von $3\mu\text{g/g}$ Körpergewicht völlig aufgehoben ist Tab.3 . In Vorversuchen konnte festgestellt werden, daß bei einer Endoxandosierung von $1,5\mu\text{g/g}$ noch eine Zellvermehrung auftrat, während bei $2,0\mu\text{g/g}$ die Transplantierbarkeit aufgehoben worden war. Ob die DNS-Synthese bei einer Konzentration von $3\mu\text{g/g}$ schon gehemmt ist, kann wegen des geringen Unterschiedes der Messergebnisse (spez. Aktivität der DNS der Kontrollen $25,3 \pm 5,15$, bei den Behandelten $20,7 \pm 4,12$) nicht gesichert werden, eine Hemmung ist jedoch anzunehmen. Eine deutliche Hemmung der DNS-Synthese wurde erwartungsgemäß mit $100\mu\text{g}$ Endoxan/g Körpergewicht festgestellt.

Da auch in diesem Fall der H^3 Thymidineinbau erst viele Stunden nach der Gabe des Medikaments gemessen wurde, kann seine Hemmung wie unter dem Einfluß von Trenimon in vivo (Seite 13) durchaus sekundär sein.

Tab. 3

H^3 Thymidineinbau und Transplantierbarkeit von Yoshidazellen nach in vivo Behandlung mit Endoxan 7 STUNDEN NACH ENDOXANGABE H^3 THYMIDIN GESPRITZT, 1 STUNDE SPÄTER TIERE GETÖTET, 50 mg ZELLEN AUFGEARBEITET, 10 mg ZELLEN TRANSPLANTIERT			
H^3 Thymidineinbau in die DNS (imp- 10^3 /Min / μ Mol DNS-P)	Endoxan mg/kg KG.		
	0	3	100
	30,6	18,1	7,32
	30,7	23,9	6,22
	16,9	20,4	3,62
	24,5	24,4	8,57
Ascites nach 7 Tagen in ml	24,1	16,6	
	0,9	-	-
	1,0	-	-
	1,2	-	-
	1,2	-	-
	-	-	-

B. Einfluß von Änderungen des Incubationsmilieus auf die Wirksamkeit alkylierender Verbindungen

1. Glucose

Nachdem die bisher beschriebenen Versuche in Abwesenheit von Glucose im Incubationsmilieu durchgeführt worden waren, erschien es wichtig festzustellen, ob die Zugabe von Glucose und die damit verbundene Vermehrung energieliefernder Substrate einen Einfluß auf die biochemische Wirkung der Zytostatika hat.

Nach Versuchen von LISS (unveröffentlicht) wird bei Ehrlich-Ascitestumorzellen die Einbaurrate von H^3 Thymidin in die DNS durch Zusatz von Glucose nicht gesteigert. Der Einbau von C^{14} Leucin in die Proteine wurde dagegen durch Glucose sogar gehemmt. Andererseits wurde die Wirkung des Trenimons auf beide Vorgänge durch Glucosezusatz stark vermindert. (Senkung der DNS-Synthese mit 10ug Trenimon/ml auf 8%, der Proteinsynthese auf 4% der Kontrollen jeweils ohne Glucose; mit Glucose erst mit 40ug Trenimon/ml Absinken der DNS-Synthese auf 34%, der Proteinsynthese auf 67% der Kontrollen; LISS, 1967) Im Gegensatz hierzu ließ sich die Mitomenwirkung auf den H^3 Thymidineinbau durch Glucose noch verstärken. Ohne Glucose sank der H^3 Thymidineinbau mit 20ug Mitomen/ml auf 40%, mit Glucose auf etwa 10% der Kontrollen ab.

Einen Überblick über die Wirkung von Mitomen und Trenimon auf Yoshidazellen in Abhängigkeit von Glucose geben die Tabellen 4 und 5. Nach Zufuhr von 0,02ml Glucose 5,4%ig wurde bei den Kontrollwerten eine geringfügige Steigerung von DNS- und Proteinsynthese festgestellt, die aber nicht bei allen Versuchen mit gleicher Deutlichkeit auftrat.

Tab. 4

Mitomenwirkung mit und ohne Glucose auf DNS- und Proteinsynthese			
80 min Inkubation einer 1% Zellsuspension in Ringer-Phosphat, nach 30min Bicarbonat an Glucoseansätze, nach 50min Aktivität- zugegeben, Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen			
Spezifische Aktivität	Mitomen $\mu\text{g/ml}$		
	0	50	100
der DNS ¹⁾ - Glucose	29,5 (100%)	23,4 (94%)	14,8 (50,2%)
+ Glucose	34,7 (100%)	27,2 (78,5%)	11,8 (34%)
des Proteins ²⁾ - Glucose	1,38 (100%)	1,14 (82,5%)	0,83 (60,1%)
+ Glucose	1,61 (100%)	1,80 (111,5%)	1,87 (116%)

¹⁾ $1 \text{ imp} = 10^3 / \text{min} / \mu \text{ Mol. DNS-P}$

²⁾ $1 \text{ imp} = 10^{-3} / \text{min} / \text{mg Prot}$

Die hemmende Wirkung von Mitomen auf den H^3 Thymidineinbau wird durch Glucose noch verstärkt, (100 μ g Mitomen/ml senken den Einbau in Anwesenheit von Glucose auf 34% der Kontrolle, in Abwesenheit von Glucose auf 50% der Kontrolle, Tab.4). Die Proteinsynthese wird jedoch durch Glucose vollständig gegen eine Hemmung bei den angewendeten Mitomenkonzentrationen geschützt.

Bei der Untersuchung der Trenimonwirkung fällt ein erheblicher Unterschied zwischen Yoshida - und Ehrlich-Ascitestumorzellen auf. Im Gegensatz zum oben erwähnten Verhalten der Ehrlich-Ascitestumorzellen hatte Glucose keinen Einfluß auf die durch Trenimon bewirkte Hemmung der DNS-Synthese an Yoshidazellen. Mit und ohne Glucose wurde etwa die gleiche Erniedrigung des H^3 Thymidineinbaus erreicht. (Tab.5) Der Einbau von C^{14} Leucin in die Gesamtproteine wurde durch Glucose auch vor dem Trenimoneinfluß geschützt, (bei 8 μ g Trenimon/ml ohne Glucose auf 49%, mit Glucose auf 95% der Kontrolle, Tab.5).

Tab. 5

Beeinflussung von DNS- und Proteinsynthese durch Trenimon nach Gabe von Glucose bzw. Glutamin			
1% IGE ZELL SUSPENSION IN RINGER-PHOSPHATPUFFER, NACH 30 MIN. AN GLUKOSE-ANSÄTZE BICARBONAT, NACH 50 MIN. AKTIVITÄT, NACH 80 MIN ENDE MITTELWERTE AUS 2 PARALLELANSÄTZEN			
Spezifische Aktivität	Trenimon μ g/ml		
	0	4	8
der DNS (Imp $\cdot 10^3$ /Min / μ Mol DNS)	Kontrolle	30,2 100%	23,6 78 %
	+Glucose	31,3 100%	24,8 79,3%
	+Glutamin	58,7 100%	27,6 47%
des Proteins (Imp $\cdot 10^3$ /Min /mg Prot.)	Kontrolle	1,34 100%	1,26 94%
	+Glucose	1,36 100%	1,41 103,5%
	+Glutamin	6,90 100%	5,50 79 8%

2. Glutamin

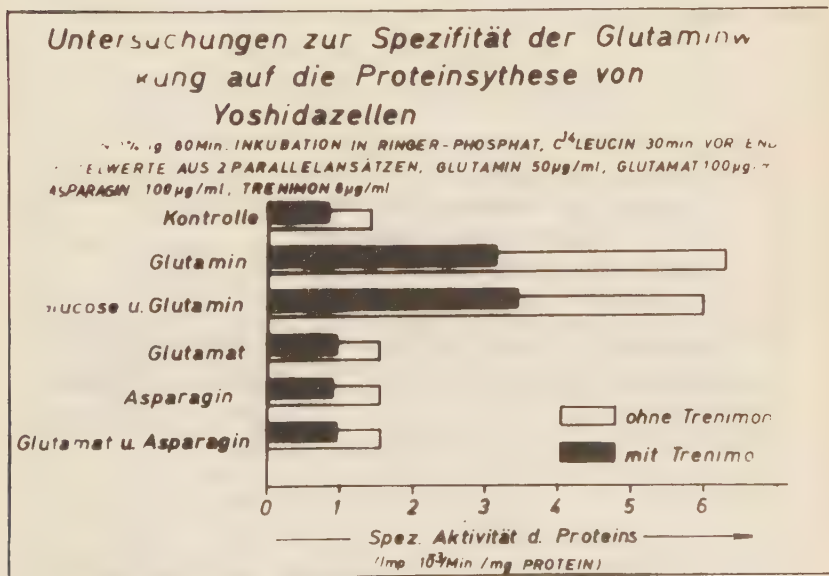
Die Wirkung von Glutamin auf Tumorzellen wurde schon von anderen Untersuchern geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß in verschiedenen Tumorzellarten offensichtlich ein Glutaminmangelzustand herrscht. Von SMULSON und NEAL (1965) stammen Untersuchungen, aus denen hervorgeht, daß beim 6C3H-ED Lymphosarkom eine größere Abhängigkeit der Proteinsynthese von exogen zugeführtem Glutamin besteht als bei den Ehrlichzellen. Der Einbau von C^{14} Leucin in die Gesamtproteine konnte nach Glutaminzufuhr beim Lymphosarkom auf 343%, bei den Ehrlichzellen nur auf 117% der Kontrollen gesteigert werden. Auch LISS (unveröffentlicht) erreichte mit Glutamin bei den Ehrlichzellen nur eine geringfügige Steigerung der Protein- und auch der DNS-Synthese; die durch Trenimon hervorgerufene Hemmwirkung beim H^3 Thymidin- bzw. C^{14} Leucineinbau wurde durch Glutaminzusatz jedoch weitgehend aufgehoben.

Bei Yoshidazellen hingegen wurde in Gegenwart von Glutamin eine in den Kontrollansätzen markante Einbausteigerung der markierten Vorstufen in die DNS und besonders in die Proteinfraction der Zellen gemessen. (Tab.5) Nach Anreicherung des Incubationsgemisches mit 50µg Glutamin/ml betrug die Steigerung der DNS-Synthese fast das doppelte und die Erhöhung der Proteinneubildung etwa das 5fache der Kontrollen ohne Glutamin.

Die relative Hemmung durch Trenimon (in % der Kontrollen) war angesichts der erhöhten Kontrollwerte der Syntheseprozesse in Gegenwart von Glutamin stärker. (Nach Anwendung von 8µg Trenimon/ml sank die DNS-Neubildung der Kontrollen ohne Glutamin auf 70%, nach Zufuhr von 50µg Glutamin/ml jedoch auf 30%.) Auf die relative Hemmung der Proteinsynthese war es von geringerem Einfluß, ob Trenimon allein oder mit Glutamin verwendet wurde. (Die Syntheseraten betrugen 49% der Kontrollen bei alleiniger Trenimonanwendung, 57% der Kontrollen bei Trenimon- und Glutaminzufuhr. Eine gegen Trenimon schützende Wirkung, wie sie LISS bei Ehrlich-Ascitestumorzellen beobachtete, übte Glutamin somit bei den Yoshida-Tumorzellen nicht aus.

Die auffällige Steigerung von DNS - und Proteinsynthese durch Glutamin in Abwesenheit von Trenimon war Anlaß zu weiteren Untersuchungen. Um festzustellen, ob die durch Glutamin bedingte Steigerung der Proteinsynthese spezifisch für Glutamin ist, wurden Yoshidazellen auch mit Glutamat und Asparagin incubiert und der Einbau von C^{14} Leucin in die Gesamtproteine gemessen. Aus Abb.4 ist zu entnehmen, daß nur mit Glutamin eine Steigerung der Proteinsynthese zu erreichen ist, während Asparagin und Glutamat einzeln oder auch zusammen zu keiner Syntheseerhöhung führten. Unter der Voraussetzung, daß auch Asparagin und Glutamat in ausreichendem Maße in die Zellen gelangen, scheint in den untersuchten Zellen weder eine Synthese von Glutamin aus Glutamat durch die Glutaminsynthase, noch der bisher nur diskutierte Weg (RAPOPORT, 1964) eines direkten Austausches der Amidogruppe des Asparagins auf das Glutamat stattzufinden, um den Glutaminmangel zu beheben.

Abb. 4



Die Anhebung der Proteinsynthese durch Glutamin läßt sich damit erklären, daß diese Aminosäure in den Zellen nicht ausreichend zur Verfügung steht. (SMULSON u. NEAL, 1965) Schwieriger ist die Deutung der gleichzeitig auftretenden Erhöhung der DNS-Synthese der Zellen nach Glutamingabe. Wegen der Bedeutung des Glutamins bei der Purinbiosynthese wurde eine Erhöhung des Nucleotidgehaltes der Zellen als Ursache für die Steigerung der DNS-Synthese in Erwägung gezogen. Tab. 6 zeigt aber, daß Zusatz von Glutamin nur eine geringfügige Steigerung des ATP-Gehaltes und des Gesamtnucleotidgehaltes verursachte. Dagegen führte eine wesentlich stärkere Erhöhung des Gehaltes an ATP und der Gesamtnukleotide durch Zusatz von Adenosin und Guanosin zu einer wesentlich geringeren Steigerung des H^3 Thymidineinbaus in die DNS als die Gabe von Glutamin. Adenosin und Guanosin, gleichzeitig mit Glutamin zugegeben, vermögen nicht die Syntheseraten noch weiter über den mit Glutamin allein erreichten Wert hinaus zu steigern. Der größte Teil der Steigerung des H^3 Thymidineinbaus in die DNS durch Glutamin dürfte daher nicht mit der Purinsynthese zusammenhängen.

Tab. 6

Einfluß von Glutamin und Nucleosiden auf biochemische Parameter				
60 Min. INKUBATION EINER 1% igen ZELLSUSPENSION IN RINGER-PHOSPHATPUFFER, NACH 30 Min. BICARBONATGABE, NACH 50 Min. GABE DER AKTIVITÄT, MITTELWERTE AUS DOPELANSÄTZEN. 50 µg/ml GLUTAMIN, GLUCOSE 0,1 ml 54% pro ANSATZ 40 µg/ml ADENOSIN bzw. GUANOSIN				
zugegebene Substanzen	spez. Akt. d. DNS ¹⁾	spez. Akt. d. Proteins ²⁾	UV-Absorb- tion bei ³⁾ 260 mµ	ATP-Gehalt in % der Kontrollen
Kontrolle	21,1	1,75	100	100
Glucose	21,2	1,60	96	112
Glutamin	55,0	5,64	98	125
Glucose u. Glutamin	56,8	6,44	104	148
Adenosin u. Guanosin	33,4	2,81	125	154
Glucose u. Glutamin Adenosin u. Guanosin	54,0	6,21	123	179

¹⁾ (imp. 10^{-3} /min/µMol. DNS-P) ²⁾ (imp. 10^{-3} /min/mg Prot.) ³⁾ im Säureextrakt in % der Kontrollen

Aufschlußreich waren in diesem Zusammenhang Versuche mit Puromycin. MUELLER et al.(1962) berichteten über eine sofortige selektive Wirkung des Puromycins auf die Proteinsynthese, während die zur Zeit der Puromycingabe laufende DNS-Synthese nicht beeinflußt wurde. Dagegen konnte eine Beschleunigung der DNS-Synthese nach Beseitigung eines Thymidinmangelzustandes in synchron wachsenden Hella-Zellkulturen mit Puromycin unterdrückt werden.

Tab.7 zeigt eigene Versuche mit Puromycin. Die durch Glutamin bedingte Steigerung der Proteinsynthese wurde durch Puromycin fast völlig verhindert. Die DNS-Synthese wurde in den Kontrollen nicht nennenswert durch Puromycin beeinflußt. Die Steigerung der DNS-Synthese durch Glutamin blieb jedoch nach Puromycingabe aus.

Tab. 7

Einfluß von Puromycin auf den Glutamin - effekt an Yoshidazellen INKUBATION DER ZELLEN 1% ig IN RINGER - TRISPHOSPHATPUFFER - GLUCOSE - LÖSUNG ÜBER 80 min, NACH 50 min AKTIVITÄTEN ZUGEGEBEN, MITTELWERTE AUS DOPPELANSÄTZEN			
Spezifische Aktivität	Puromycin µg/ml		
	0	20	40
der DNS			
Kontrolle	48,0	47,7	42,9
+ Glutamin ($1 \text{ Imp} \cdot 10^{-3} \text{ min} / \mu \text{ Mol. DNS-P}$)	111,0	55,4	44,3
des Proteins			
Kontrolle	1,49	0,57	0,19
+ Glutamin ($1 \text{ Imp} \cdot 10^{-3} \text{ min} / \text{mg Prot.}$)	5,91	1,06	0,28

Diese Ergebnisse lassen es möglich erscheinen, daß die durch Glutamin bedingte Steigerung der DNS- und Proteinsynthese nicht unabhängig von einander erfolgen, und daß somit ein Teil der DNS-Synthese an eine vorangehende oder gleichzeitig stattfindende Proteinsynthese gebunden ist.

C. Vergleichende Untersuchungen an Yoshida-Ascites-Sarkomzellen von Ratte und Maus

Die beschriebenen Versuche wurden aus anfangs erwähnten Gründen mit Yoshida-Asciteszellen durchgeführt, die von ihrem eigentlichen Wirt, der Ratte, auf die Maus übertragen worden waren. Die folgenden Versuche sollen zeigen, daß mit der Veränderung des Wirtstieres keine Veränderung der Tumorzellen einhergeht, die von wesentlicher Bedeutung für die Art der durchgeführten Versuche sein könnte. Zunächst wurde die Empfindlichkeit biochemischer Parameter an Yoshida-Asciteszellen der Ratte nach Incubation mit Trenimon untersucht, wobei weder die DNS- noch die Proteinsynthese ein grundsätzlich neues Verhalten zeigten. Die Empfindlichkeit der Proteinsynthese gegen Trenimon erschien allerdings etwas deutlicher (Tab.8) als die von Mause-Asciteszellen (Tab.5) .

Tab. 8

Einbau von H^3-Thymidin und C^{14}-Leucin in Yoshidazellen der Ratte nach Gabe von Trenimon			
60 Min. INKUBIERT, NACH 50 Min. ZUGABE VON H^3THYMIDIN UND C^{14}LEUCIN, MITTELWERTE AUS 2 PARALLELANSATZEN			
Spezifische Aktivität	Trenimon $\mu g / ml$		
	0	4	8
der DNS (Imp $\cdot 10^3 / Min. / \mu Mol. DNS-P$)	76,0	51,9	50,7
des Proteins (Imp $\cdot 10^3 / Min / mg PROTEIN$)	2,23	0,214	0,167

Um zu sichern, daß die durch Glutamin bedingten Steigerungen der DNS- und Proteinsynthese nicht nur auf einem eventuellen Glutaminmangel im Mause-Ascites beruhten, wurden gewaschene Yoshidazellen von Ratte und Maus mit Rattenascitesserum incubiert. Dabei zeigte es sich, daß auch an den Yoshidazellen der Ratte ein Glutamineffekt auftritt. (Tab.9) Da zum einen nach Incubation der Zellen mit dem Serum keine Steigerung der biochemischen Parameter über den in den Kontrollen festgestellten Wert auftrat, zum anderen auch nach Anwendung von Serum und Glutamin eine Steigerung von DNS- und Proteinsynthese zu verzeichnen war, ist anzunehmen, daß auch in den Yoshidazellen der Ratte ein Glutamineffekt auftritt und daß im Rattenascites keine größeren Glutaminkonzentrationen vorliegen können.

Tab. 9

Vergleich zwischen auf der Maus und auf der Ratte gewachsenen Yoshidazellen GEWASCHENE ZELLEN 80 Min IN RINGER-TRISPHOSPHATPUFFER-GLUKOSE- LÖSUNG INKUBIERT, AKTIVITÄTSGABE 30 Min. VOR ENDE, ASCITESSERUM MIT 3 TEILEN phys. NaCl / ERDÜNNT 0,5 ml / ANSATZ, MITTELWERTE (2 ANSÄTZE)			
Yoshida-Ascites-Zellen		Spezifische Aktivität	
		der DNS	des Proteins
von der Maus	Kontrolle	21,4	1,69
	+ Glutamin	58,1	6,0
	+ Rattenascitesserum	12,3	1,48
	Rattenascitesserum + Glutamin	42,2	7,2
von der Ratte	Kontrolle	31,2	1,9
	+ Glutamin	51,2	5,49
	+ Rattenascitesserum	30,3	1,87
	Rattenascitesserum + Glutamin	49,5	5,25

D. Anhang

(Versuche zur Erzeugung eines resistenten Tumors)

Gleichzeitig mit dem Beginn der Untersuchungen an Yoshidazellen war die Züchtung gegen Endoxan resistenter Yoshidazellen in Angriff genommen worden. Bis zum Abschluß dieser Versuche hatte es sich jedoch herausgestellt, daß bei den sensitiven Zellen die biochemischen Parameter viel unempfindlicher sind als die Hemmung der Zellvermehrung. Ein Vergleich der Beeinflussbarkeit biochemischer Reaktionen zwischen normalen sensitiven Zellen und gegen Endoxan resistenten Zellen erschien deshalb wenig ergiebig, so daß im Rahmen dieser Arbeit nur über die Züchtung resistenter Zellen berichtet werden kann.

LETTRE' hatte bereits 1960 darauf hingewiesen, daß eine Tumorzellpopulation nicht homogen sei, sondern Zellen verschiedener Empfindlichkeitsgrade enthalte. Durch chemische Selektion sollte die Entwicklung von Resistenzlinien möglich sein. Aus einer Mitteilung von WILMANNS (1964) geht hervor, daß bei Resistenzentwicklungen auch Enzymreaktionen wie z.B. die Erhöhung der Aktivität der Dihydrofolsäurereduktase eine Rolle spielen können. Eine Änderung der Enzymaktivität könnte durch eine Adaptation der Zellen an die Zytostatika erklärt werden. Von anderen Autoren z.B. UJHAZY (1965) ist auch eine Mutation der Zellen durch die Zytostatika mit anschließender Selektion bei weiterer Behandlung angenommen worden. Die genauen Ursachen der Resistenzentwicklung sind aber noch unbekannt.

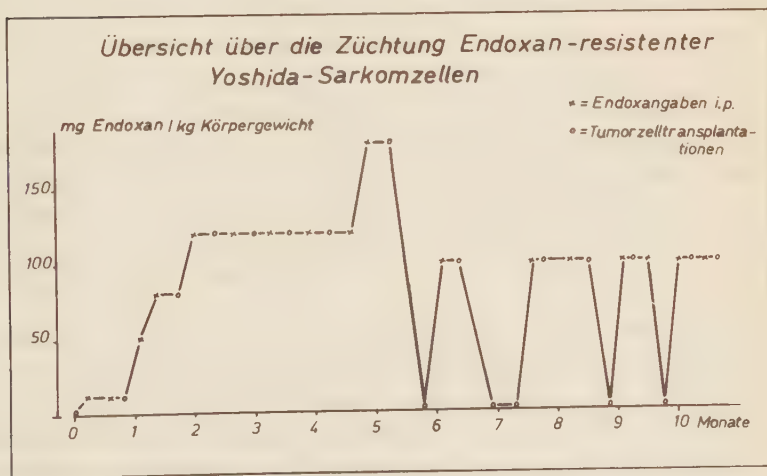
Von vielen Untersuchern wurden Angaben über die Züchtung gegen zytostatische Behandlung resistenter Zellen gemacht, z.B. OBOSHI, (1959), JACKSON, (1954), SKIPPER u. SCHABEL, (1962) und SCHMIDT, (1962). Eine Zusammenfassung gab WHEELER (1963). LANE (1960) berichtete über die Entwicklung einer gegen Endoxan resistenten Leukämie. UJHAZY (1965) beschrieb die Züchtung gegen Tri-(chloräthyl)aminhydrochlorid (Präparat TS-160) resistenter Yoshidazellen.

Für die Züchtung resistenter Yoshidazellen erschien Endoxan geeignet, weil es schon in geringer Dosierung das Wachstum der sensitiven Zellen aufhebt. Endoxan wird aber zum anderen

auf Grund seiner großen therapeutischen Breite noch in hohen Dosen vom Tierorganismus toleriert. (LANE, 1959)

Eine Übersicht über die Entwicklung Endoxan resistenter Yoshida-Sarkomzellen gibt die Abb. 5. Aus einer Gruppe von 12 Ratten mit soliden Yoshidatumoren, die mit 12mg Endoxan/kg behandelt worden waren, war nach anfänglich vollständigem Tumorrückgang in 3 Fällen ein neuer Tumor gewachsen. Diese Tiere dienten als Ausgangspunkt der Züchtung, die mit langsam steigenden Endoxandosierungen durchgeführt wurde, Dabei wurde das Endoxan jeweils jenen Tieren i.p. verabfolgt, bei denen gerade ein Tumor zu palpieren war. Wenn die Tumoren einige Zeit nach der Endoxanbehandlung wieder zu wachsen begannen, wurden die Tiere getötet und das Tumorgewebe abpräpariert. Die aus dem Gewebe bereitete Zellsuspension wurde an unbehandelte Ratten flach i.m. gespritzt.

Abb. 5



Aus Abb.5 geht hervor, daß nach etwa 2 Monaten eine Endoxan-konzentration von 120mg/kg toleriert wurde. Eine Steigerung über 180mg Endoxan/kg hinaus war wegen des bei diesen Dosierungen auftretenden Tierverlustes nicht ratsam. Nach der eingetretenen Resistenz wurde mit einer Dosierung von 100mg Endoxan/kg, die als Resistenzerhaltungsdosis ausreichen müßte, weiterbehandelt, wobei auch einige Passagen ohne Endoxanbehandlung eingefügt wurden. Während auch bei der Endoxanbehandlung mit 100mg/kg zunächst noch eine Wachstumseinschränkung der Tumoren eintrat, wurde diese Dosierung im weiteren Verlauf der Behandlung ohne Wachstumsrepression von den Tumoren toleriert. Daher wurden in Abb.5 die Abstände zwischen den Transplantationen ungefähr ab Monat 9 etwas verringert.

Diskussion

Der Nachweis kausaler Zusammenhänge zwischen der Veränderung eines biochemischen Parameters und der Hemmung der Zellvermehrung stößt bei der Untersuchung der Wirkung alkylierender Zytostatika auf Schwierigkeiten. Die Tatsache, daß eine Beeinflussung im gleichen Dosisbereich auftritt, läßt zwar die Möglichkeit eines Zusammenhanges zu, sie kann aber angesichts der Unspezifität der Wirkung der alkylierenden Verbindungen auch zufällig sein.

Die umgekehrte Schlußfolgerung, daß kein Zusammenhang besteht, ist dagegen unter geeigneten Voraussetzungen mit größerer Sicherheit zu ziehen. Wenn ein Vorgang wie hier die Hemmung der DNS-Synthese erst bei Medikamentkonzentrationen auftritt, die 20 - 1000 fach höher liegen als die Konzentrationen, die für eine Hemmung der Zellvermehrung ausreichen, so kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, daß dieser Vorgang für die Hemmung der Zellvermehrung ursächlich ist. Aus den in vitro Versuchen kann daher gefolgert werden, daß die Hemmung der DNS-Synthese, obwohl sie bei niedrigeren Dosen eintritt als die Beeinflussung anderer biochemischer Parameter (z.B. DPN-Gehalt und Glycolyse HOLZER et al. 1956 u. 1958), auch nur eine sekundäre Reaktion ist. Die Hemmung der Zellvermehrung und die mit ihr zusammenhängenden chemischen Vorgänge sind noch unklar. Eventuell gibt es durch direkte Alkylierungen Veränderungen am DNS-Molekül, die zwar die Biosynthese neuer DNS für eine gewisse Zeit noch zulassen, die Kernteilung aber verhindern.

Das Fehlen eines Zusammenhanges zwischen Hemmung der DNS-Synthese und der Hemmung der Zellvermehrung ließ sich bei den von LISS und PALME (1964) beschriebenen Versuchen mit Ehrlich-Ascitestumorzellen - wenn überhaupt - nur unter dem Einfluß von Trenimon erkennen, während es bei den jetzt durchgeführten Versuchen bei allen verwendeten alkylierenden Verbindungen deutlich wird. Es besteht aber kein Anlaß anzunehmen, daß es hinsichtlich des zytostatischen Wirkungsmechanismus der alkylierenden Verbindungen zwischen verschiedenen Transplantationstumoren ein wesentlicher Unterschied besteht.

Unterschiede erheblicher Art bestehen allerdings zwischen den Dosen, die bei den verschiedenen Tumoren zur Hemmung der Zellvermehrung führen, dagegen werden zu der (als sekundär eintretend erkannten) Hemmung der DNS-Synthese auffälliger Weise etwa gleich hohe Dosen benötigt. An dieser Stelle soll aber darauf verwiesen werden, daß die mit sehr unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Zytostatika erreichte Hemmung der Zellvermehrung keine Aussage über die Güte der betreffenden Verbindung zuläßt. Die Brauchbarkeit eines Pharmakons in der Therapie ist nicht durch die absolute Wirksamkeit (Dosis in g oder mg) gegeben, sondern sie hängt entscheidend von seiner therapeutischen Breite ab, die durch das Verhältnis von letaler Dosis zur kurativen Dosis bestimmt wird. Hierfür dient als Kennzahl der „Therapeutische Index“, der von BROCK u. GEKS (1951) als das Verhältnis der LD_5 zur CD_{95} festgesetzt wurde. Da in der Krebs-Chemotherapie die kurative Dosis nur unzureichend bestimmbar ist, wurde von DRUCKREY et al. (1964) vorgeschlagen, die Dosierung in Prozenten der genau bestimmbaren mittleren letalen Dosis ($\%LD_{50}$) auszudrücken. Sie wurde als „Therapeutische Einheit (TE)“ bezeichnet.

Besondere Erwähnung bedürfen die Ergebnisse der in vivo Versuche. Wie aus Gegebenheit des Generationszyklus in einer asynchron wachsenden Zellpopulation folgt, kommt es einige Zeit nach Hemmung der Zellteilung zu einem Verschwinden von Zellen, die neu mit der DNS-Synthese beginnen. Dadurch kann es zu einer Herabsetzung des H^3 Thymidineinbaus in die gesamte Zellpopulation kommen, die nichts mit einer direkten Hemmung der DNS-Synthese zu tun zu haben braucht. Da bei den beschriebenen in vivo Versuchen der H^3 Thymidineinbau immer erst einige Stunden nach Gabe der Medikamente gemessen wurde, ist mit diesem Effekt zu rechnen.

Das Verständnis von Versuchsergebnissen wird unter Umständen dadurch erschwert, daß es unter dem Einfluß von Trenimon (möglicherweise auch bei den anderen alkylierenden Verbindungen) nicht nur zu einem Ausbleiben des Neueintritts von Zellen in die DNS-Synthesephase, sondern auch zu einem Fehlen

des Austritts aus dieser Phase kommen kann, wodurch sich der Prozentsatz an DNS-synthetisierenden Zellen nicht verändert. Diese Verhältnisse, wonach es wahrscheinlich nach Abschluß der normalen DNS-Verdopplung zu einer weiteren Zunahme der DNS in einzelnen Zellkernen kommt, wurde von LISS et al. (1968) ausführlich diskutiert.

Der Einfluß von Glucose und Glutamin auf die Wirkung der Zytostatika in in vitro Versuchen wurde bereits an Hand der Ergebnisse eingehend erörtert, so daß sich an dieser Stelle eine nochmalige Diskussion erübrigt.

Zusammenfassung

An Yoshida-Ascites-Sarkomzellen wurde in vivo und in vitro der Einfluß verschiedener alkylierender Substanzen auf die DNS-Synthese (H^3 Thymidineinbau) und die Zellvermehrung nach der Weitertransplantation untersucht.

Bei in vitro Versuchen waren die für die Hemmung der DNS-Synthese erforderlichen Dosen je nach Art des Medikamentes (Mitomen, Endoxan u. Trenimon) 20 - 1000-fach größer als die für die Hemmung der Zellvermehrung ausreichenden Dosen. Aus diesen Relationen folgt, daß die Hemmung der DNS-Synthese nicht das für die zytostatische Wirkung der alkylierenden Verbindungen ursächliche Ereignis sein kann.

Mit den langdauernden in vivo Versuchen lassen sich nicht so eindeutige Schlüsse ziehen, weil in diesem Fall die Hemmung des H^3 Thymidineinbaus eine Folge der primär erfolgenden Hemmung der Zellteilung sein kann.

Für die Hemmung der DNS-Synthese mit Trenimon und Mitomen in vitro war es von geringem Einfluß, ob die Versuche in Gegenwart von Glucose durchgeführt wurden oder nicht.

In Gegenwart von Glutamin wurde eine erhebliche Steigerung der DNS - und besonders der Proteinsynthese beobachtet. Die prozentuale Hemmung der DNS-Synthese durch Trenimon war in Gegenwart von Glutamin stärker, weil die Kontrollwerte erheblich höher lagen. Dieser Befund sowie Versuche in Gegenwart von Puromycin lassen darauf schließen, daß das Auftreten einer optimalen DNS-Synthese vom gleichzeitigen Ablauf der Proteinsynthese abhängt.

Es gelang ein gegen Endoxan resistentes Yoshidasarkom zu züchten, das im Vergleich zum sensitiven Tumorstamm die etwa 15fache Dosis vertrug.

Literaturübersicht

1. BROCK, N. u. F.J.GEKS; Naturwissenschaften 38, 351, (1951)
2. BROCK, N.; Arzneimittel-Forsch. 8, 1, (1958)
3. BROCK, N. u. H.J.HOHRST; Arzneim.-Forsch. 13, 1021, (1963)
4. BURTON, K.; Biochem. J. 62, 315, (1956)
5. DOMAGK, G. u. Ch.HACKMANN; Therapie maligner Tumoren, 1.Band, S.1-32, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1966)
6. DONTENWILL, W., M.ZAGEL u. U.MOHR; Z. Krebsf. 65, 1, (1964)
7. DRUCKREY, H.; Medizin. Klinik 56, Nr.34, 1421, (1961)
8. DRUCKREY, H., D.STEINHOFF, M.NAKAYAMA, R.PREUSSMANN u. K.ANGER; in H.WILMANN, Chemotherapie maligner Tumoren, S.11-24 Schattauer Verlag, Stuttgart (1964)
9. EMMELOT, P. in Molecular Pharmacology S.55, Academic Press New York a. London (1964)
10. GROSS, R.; Therapiewoche 14, 7, 368, (1964)
11. HILZ, H., B.HUBMANN, M.OLDENKOP, M.SCHOLZ u. M.V.GOSSLER; Biochem. Z. 336, 62, (1962)
12. HÖLZEL, F.; Z. Naturforsch. 16b, 792, (1961)
13. HÖLZEL, F. u. H.MAASS; Dtsch.Med.Wschr. 87, 1663, (1962)
14. HOLZER, H., G.SEDLMAYER, A.CHEMNITZ; Biochem.Z. 328, 183, (1956)
15. HOLZER, H., P.GLOGNER, G.SEDLMAYER; Biochem.Z. 330, 59, (1958)
16. JACKSON, H.; Brit.J.Cancer 8, 336, (1954)
17. KLINKE, F., E.LISS u. G.PALME; Radionuklide in der klinischen und experimentellen Onkologie, Schattauer Verlag, Stuttgart 1965, S.47-53
18. LANE, M.; Cancer Chemother. Rep. 3, 1, (1959)
19. LANE, M. u. S.T.YANCEY; Nature 188, 756, (1960)
20. LETTRE, H.; Antibiotica et Chemotherapia Basel 8, 166, (1960)
21. LISS, E., F.KLINKE, G.PALME; Z.Krebsforsch. 68, 73, (1966)
22. LISS, E., G.PALME; Mitteilungsdienst GBK, 3, 457, (1964)

23. LISS,E.; Habilitationsschrift, Berlin 1967
24. LISS,E.,G.PALME u. K.OEFF; in Druck (1968)
25. LOWRY,O.H.,N.J.ROSEBROUGH,A.L.RARR and R.J.RANDALL;
J. biol. chem. 193, 265, (1951)
26. MUELLER,G.C.,K.KAJIWARA,E.STUBBLEFIELD and R.R.RUECKERT;
Cancer Res. 22, 1084, (1962)
27. OBOSHI,S.; Gann, 50, 147, (1959)
28. PAPAC,R.J.; Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 3, 350,(1962)
29. PÜTTER,J.; Therapie maligner Tumoren, 1. Band S.80-138
Ferdinant Enke Verlag Stuttgart 1966
30. RAPOPORT,S.M.; Medizinische Biochemie, VEB Verlag Volk u.
Gesundheit, Berlin 1964, S.451
31. RATHGEN,G.H.,H.A.KÜNKEL,H.MAASS; Acta Un. int. Cancer
16, 725, (1960)
32. ROSS,W.C.J.; Biological alkylating agents, Butterworths,
London 1962
33. RÜTER,J.,H.VACHEK,M.OLDEKOP,I.WÜPPEN u. H.HILZ;
Biochem. Z. 344, 153, (1966)
34. RUTMAN,R.J.; in H.WILMANN'S Chemotherapie maligner Tumoren
Schattauer Verlag, Stuttgart 1964 S.151-156
35. SKIPPER,H.E.,F.K.SCHABEL; Canc. Chemother. Rept. 22, 1,
(1962)
36. SCHMÄHL,D.,H.DRUCKREY; Naturwissenschaften 43, 199, (1956)
37. SCHMÄHL,D.,H.OSWALD,C.THOMAS; Z. Krebsforsch. 67, 141,
38. SCHMIDT,C.G.; Mitteilungsdienst GBK, 1, 2, (1966) (1965)
39. SCHMIDT,L.H.; Cancer Chemotherapy Rept. 16, 25, (1962)
40. SMULSON,M.E.,A.L.NEAL; Arch. Biochem. and Biophys.
112, 25, (1965)
41. TRAMS,E.G.,M.V.NADKARNI,P.K.SMITH; Cancer Res. 21, 560 u.
567, (1961)

- 42. UJHAZY,V.,A.WINKLER; Neoplasma 12, 11, (1965)
- 43. WENZEL,M.,P.E.SCHULZE; Tritium-Markierung, Darstellung und Anwendung nach Wilzbach H^3 -markierter Verbindungen, S.113, Berlin: Walter de Gruyter & Co. 1962
- 44. WHEELER,G.P.; Cancer Res. 22, 651, (1962)
- 45. WHEELER,G.P.; Cancer Res. 23, 1334, (1963)
- 46. WHEELER,G.P.,J.A.ALEXANDER; Cancer Res. 24, 1337,(1964)
- 47. WILMANNS,H.; in Chemotherapie maligner Tumoren Schattauer Verlag, Stuttgart 1964, S.1

Lebenslauf

Am 28.4.1941 wurde ich, Albrecht Reinecke, als Sohn des Landgerichtsdirektors Dr. Rudolf Reinecke und seiner Ehefrau Else Reinecke geb. Wickardt in Magdeburg geboren.

Von 1947 - 1959 besuchte ich in Wernigerode/Harz die Grundschule und später die Oberschule, die ich im Sommer 1959 mit bestandenem Abitur verließ. Danach wurde ich bis Anfang 1961 im VEB Getriebewerk in Wernigerode als Maschinenschlosser ausgebildet.

Im Sommer 1961 siedelte ich in die Bundesrepublik über. 1962 bestand ich nach einjährigem Kurs in Wuppertal die Sonderprüfung für SBZ-Abiturienten.

Im Herbst 1962 begann ich an der Freien Universität mit dem Medizinstudium. 1963 bestand ich das Vorphysikum, 1965 das Physikum und beendete das Studium an der gleichen Universität mit Bestehen des Staatsexamens am 19.9.1968.

